

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Obor Biologie**



**Bakalářská práce**

**Aktin a jeho regulace v klatrinové endocytóze**

**Actin and its regulation in clathrin endocytosis**

**Denisa Pešanová**

**Vedoucí práce: RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.**

**Praha 2011**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lence Libusové, Ph.D. za její trpělivost při odborných konzultacích a za možnost pracovat v laboratoři molekulární genetiky vývoje, což mi umožňuje rozšiřovat mé dosavadní znalosti.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Libusové, Ph.D. na základě citované literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 30. 4. 2011

## Abstrakt

Aktinová vlákna a jejich dynamika hrají důležitou roli při přestavbě povrchu eukaryotických buněk. Regulační proteiny aktinu mají významný vliv na řízení aktinové dynamiky. Během klatrinové endocytózy se na plazmatické membráně stýkají aktin a regulační proteiny s klatrinem a adaptorovými proteiny, aby se společně podílely na vchlípení membrány a odštěpení váčku. Aktinové struktury jsou zásadní pro vznik, internalizaci i pohyb endocytovaných váčků u kvasinek. U savčích buněk ještě není účast aktinu zvláště v časných fázích endocytózy dobře objasněna. I přes využití nejmodernějších zobrazovacích metod neexistují ustálené modely ukazující zřejmě odlišné role aktinu v klatrinové endocytóze u kvasinek a v savčích buňkách. Tato práce se snaží nalézt soulad kontroverzních výsledků nedávných studií a komplexnosti procesu regulace aktinu. Předkládá shrnutí současných hypotéz a mechanismy interakcí nejvýznamnějších proteinů, které ovlivňují dynamiku aktinu v procesu klatrinové endocytózy.

## Klíčová slova

aktin, klatrinová endocytóza, *Saccharomyces cerevisiae*, regulační proteiny

## **Abstract**

Actin filaments and their dynamics play an important role in eukaryotic membrane remodelling. Actin regulatory proteins are required for actin dynamics control. During clathrin-mediated endocytosis actin and regulatory proteins interact with clathrin and adaptor proteins. Together they assist membrane invagination and scission of vesicles. Actin structures are fundamental for formation, internalization and movement of endocytic vesicles in yeast. In mammalian cells, actin is less involved especially in the early stage of endocytosis. Models reflecting different roles of actin in clathrin-mediated endocytosis in yeast and mammals are still lacking despite the latest imaging methods. The goal of this bachelor thesis is to offer a compact summary of controversial observations of actin regulation in endocytosis based on recent studies and simultaneously present selected mechanisms of interactions of the most important proteins, which influence actin dynamics in the clathrin-mediated endocytosis.

## **Key words**

actin, clathrin-mediated endocytosis, *Saccharomyces cerevisiae*, regulatory proteins

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2 Endocytóza.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Aktin.....</b>	<b>9</b>
3.1 Aktin vázající proteiny .....	10
<b>4 Regulační domény ABP zapojených v CME.....</b>	<b>11</b>
<b>5 Aktin a CME.....</b>	<b>14</b>
5.1 Odlišnosti savčího a kvasinkového modelu v průběhu klatrinové endocytózy.....	17
<b>6 Regulace aktinu v CME.....</b>	<b>18</b>
6.1 Regulace aktinové nukleace při interakci s plášťovým komplexem a membránou.....	18
6.1.1 Adaptorové proteiny v CME .....	22
Sla2 / Hip1R .....	22
Sla1 / komplex CD2AP/CIN85.....	22
6.2 NPF.....	22
6.2.1 Las17 / WASP .....	23
6.2.2 Myo3 a Myo5 / myoziny typu I.....	23
6.2.3 Ostatní NPF .....	24
6.3 Regulační proteiny aktinové polymerace.....	24
6.3.1 Capping proteiny (čapkové proteiny) .....	25
6.3.2 Aktin depolymerizující faktor ADF / kofilin .....	25
6.3.3 Svazující proteiny .....	26
6.4 Regulační proteiny aktinu při odštěpení váčku.....	26
<b>7 Shrnutí funkce aktinových vláken v průběhu CME .....</b>	<b>29</b>
<b>8 Závěr.....</b>	<b>30</b>
<b>9 Seznam literatury .....</b>	<b>31</b>
9.1 Elektronické zdroje.....	37
<b>10 Seznam příloh .....</b>	<b>38</b>

## Zkratky

<b>AAK</b>	adaptor-associated kinase	s adaptorem asociující kináza
<b>ABD</b>	actin binding domain	aktin vázající doména
<b>ABP</b>	actin binding protein	aktin vázající protein
<b>ADF</b>	actin depolymerizing factors	aktin depolymerizující faktor
<b>ANTH</b>	AP180 N-terminal homology	AP180 N-terminální doména
<b>Ark1</b>	Actin Regulating Kinase	aktin regulující kináza
<b>Arp2/3 komplex</b>	actin related protein complex	aktinu příbuzný proteinový komplex
<b>BAR</b>	binding–amphiphysin–Rvs	vazebný amphiphysin Rvs
<b>CME</b>	clathrin-mediated endocytosis	klatrinová endocytóza
<b>EH</b>	eps15 homology domain	epsinová doména
<b>ENTH</b>	epsin NH2-terminal homology	epsin eN koncová doména
<b>F-aktin</b>	filament actin	filamentární aktin
<b>GAK</b>	cyclin associated G kinase	G kináza asociovaná s cykliny
<b>G-aktin</b>	globular actin	globulární aktin
<b>GDB</b>	GTP binding domain	GTP vazebná doména
<b>Hip1</b>	Huntingtin-interacting protein 1	Huntington interagující protein 1
<b>Hip1R</b>	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	Huntingtonu 1 příbuzný interagující protein
<b>Las17</b>	Local Anestheticum Sensitive	senzitivní k místním anestetikům
<b>NPF motiv</b>	asparagine-proline-phenylalanine	asparagin-prolin-fenylalanin motiv
<b>NPFs</b>	nucleation promoting factors	nukleaci podporující faktory
<b>Pan1p</b>	Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) riboNuclease	dependentní ribonukleáza
<b>PIP2</b>	phosphatidylinositol- 4,5 -bisphosphate or PtdIns(4,5)P2	fosfatidylinositol- 4,5 -bisfosfát
<b>pre-mRNP</b>	pre-messenger ribonucleoprotein particles	pre - ribonukleoproteinová částice
<b>Prk1</b>	p53 Regulatory Kinase	p53 regulovaná kináza
<b>SH3</b>	Src homology 3	sarkom homologní doména
<b>Sla1</b>	Synthetic Lethal with ABP1	synteticky letální s ABP1
<b>TH1/2</b>	tail homology 1 domain	koncová doména (vázající se na lipidy)
<b>TIRF</b>	total internal reflection fluorescence	metoda totálního odrazu fluorescence
<b>VCA</b>	verprolin, cofilin, acidic	verprolin, kofilin, kyselý motiv
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich syndrom protein	protein Wiskott Aldrichova syndromu
<b>WH2</b>	WASP homology domain-2	verprolinová doména
<b>WIP</b>	WASP-interacting protein	WASP interagující protein

# 1 Úvod

Endocytóza je proces, při kterém dochází vlivem různých regulačních, adaptorových, signálních a strukturních proteinů k vtažení částí plazmatické membrány dovnitř buňky, což ovlivňuje dynamiku transportu transmembránových proteinů i navázaných molekul, které jsou součástí váčku (Robertson et al., 2009b). Endocytóza umožňuje cirkulaci a tím obnovu membrány časných nebo pozdních endosomů a lysosomů. Aktin se jako jeden ze základních stavebních kamenů cytoskeletu významně zapojuje do procesu endocytózy.

Studium problematiky regulace aktinu v endocytóze započalo teprve nedávno. Před 18 lety bylo pomocí základních genetických metod prokázáno spojení mezi aktinem a endocytózou. V jednom z prvních testů bylo použito mutantů aktin vazebných proteinů. Jejich mutace zablokovala vychytávání fluorescenčně označeného proteinu z mezibuněčného prostoru, což způsobilo nefunkčnost endocytózy a dokázalo zapojení aktinu v procesu klatrinové endocytózy (Kübler a Riezman, 1993). Moderní biologické postupy umožňují dále rozvíjet tuto tematiku. Využívá se zejména imuno-elektronové mikroskopie nebo mikroskopie metodou totálního odrazu (TIRF - **T**otal **i**nternal **r**eflection **f**luorescence microscopy), která dovoluje snímat a zkoumat věci ve vymezeném prostoru těsně pod plazmatickou membránou (Kirchhausen, 2009), a také metody snímání buňky v reálném čase (life cell imaging).

Výzkum úlohy aktinu a endocytózy stále bouřlivě probíhá, o čemž svědčí i fakt, že databáze PubMed eviduje za posledních pět let více jak polovinu z celkového počtu dosud publikovaných článků s klíčovými slovy „aktin a klatrinová endocytóza“.

Hlavním tématem této práce je popis úlohy aktinu a jeho regulačních proteinů v klatrinové endocytóze. Regulace aktinu v endocytóze má signifikantní vliv na transport molekul směrem ven i dovnitř buňky. Regulační proteiny aktinu jsou podstatnou součástí endocytózy a jejich počet je obrovský. Vzhledem k tomu, jak komplexní roli aktin v endocytóze hraje, zůstává na tomto poli stále dost rozporuplných výsledků.

## 2 Endocytóza

Dle definice je endocytóza proces, při kterém se vchlipuje plazmatická membrána do buňky, čímž se ve výsledku vytvoří váčky, které jsou schopny splynout s časným endozómem a vstoupit tak do systému endo-lysosomálních membrán (Smythe a Ayscough, 2006). Rozumím tím tedy všechny mechanismy, při kterých vniká do buňky materiál z okolního prostředí přes plazmatickou membránu.

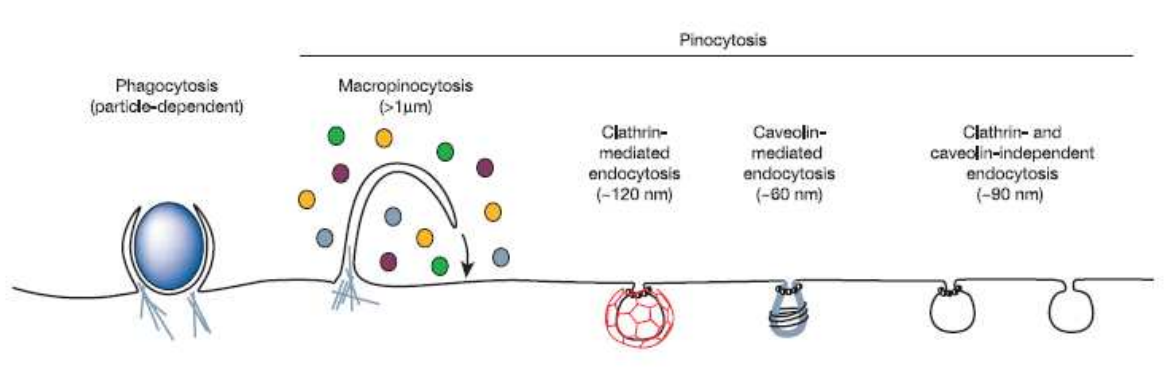
Díky propojení endocytózy a exocytózy dochází k recyklaci membrán, jejich lipidů, proteinů a k vychytávání receptorů, čímž buňka ušetří energii, kterou by spotřebovala na jejich neustálou *de novo* syntézu. Endocytóza také udržuje konstantní povrch buňky a využívají ji některé patogeny nebo toxiny jako vstupní bránu do lumen buňky (Doherty et al., 2009).

Ať v rámci jedné buňky nebo u různých buněčných typů byly definovány specifické znaky, díky nimž si můžeme endocytózu uspořádat pro potřeby přehlednosti do jednotlivých kategorií. U dnešních mnohobuněčných organismů nalezneme několik cest, jež se mohou částečně překrývat a zastupovat. Jednotlivé cesty se dělí dle mechanismu, kterým se váček utváří nebo podle nákladu, který váček přenáší. Další možností je dělení dle zapojení signalizačních molekul nebo jejich receptorů. U složitých buněk, jako jsou savčí, existují desítky speciálních kategorií endocytózy. Buňka přizpůsobuje svou endocytickou aktivitu jak vnějším podmínkám, tak potřebám vnitřního prostředí buňky samotné (Kumari et al., 2010; Engqvist-Goldstein et al., 2003). Kategorií označujících endocytické procesy je velké množství. Zde se přidržím dělení dle (Conner a Schmid, 2003) (viz Obr. 1), protože ho shledávám úsporným a věcným. Nezabíhá do detailů, které by mohly téma znepřehlednit. Ve zmíněné práci se endocytóza dělí na 2 dráhy:

1. Fagocytóza - speciální proces, kdy některé eukaryotické buňky pohlcují pevný materiál (např. mikroorganismy nebo buněčný derbis).
2. Pinocytóza - vchlípení membrány a pohlcení extracelulární tekutiny. Tato cesta se dále dělí dle hlavních proteinů účastnících se vchlípení membrány:
  - ❖ klatrinová endocytóza (CME - **C**latrin **m**ediated **e**ndocytosis)
  - ❖ kaveolární endocytóza
  - ❖ kaveolin-klatrin nezávislá endocytóza

Předpokládá se, že endocytický proces může probíhat více než jednou cestou v rámci jedné buňky (viz Obr. 1).





**Obr. 1 – Klasifikace endocytózy v savčích buňkách**

Jedna buňka může provádět endocytózu více způsoby. Znázorněny jsou některé z možností, které buňky mohou využít (Převzato z Conner a Schmid, 2003).

### 3 Aktin

V roce 1887 byl objeven cytoplazmatický protein, jehož struktura byla popsána později biochemikem Straubem, který ji označil jako aktin (Szent-Gyorgyi, 1945). Velikost aktinu je zhruba 42kDa a má ATPázovou aktivitu. Je schopen existovat ve třech formách:

1. monomerní – označuje se též jako globulární (G-aktin)
2. filamentární – polymerovaný do vláken (F-aktin)
3. jaderný aktin – účastní se jaderného exportu, transkripce a specificky podporuje funkci RNA polymeráz I, II a III, může být součástí remodelujícího komplexu nebo pre-mRNP (pre-messenger ribonucleoprotein particles) (Zheng et al., 2009)

Dlouhodobé výsledky výzkumu aktinu naznačují, že aktin samotný i jeho vyšší struktury jsou zapojené v celé řadě buněčných procesů, jako je udržení morfologie buněk, buněčná polarita, cytokineze, pohyb cytosolu, svalová kontrakce, endocytóza a také váčkový a organelový transport. Tento pohyb je zajištěn pomocí molekulárních motorů myozinu typu I a aktinu (Allison, 1973; Kim et al., 2006). Aktin též hraje klíčovou úlohu v přenosu signálů, které vyžadují jeho dynamiku (Stricker et al., 2010; Weihs, 1979).

Podobně jako ostatní cytoskeletální proteiny aktin polymeruje a tvoří velké struktury, které mohou mít délku až několik mikrometrů. Vzniklá mikrofilamenta jsou polarizovaná, což znamená, že mají dva odlišné konce: „barbed end“ (+ konec) a „pointed end“ (- konec) (Pollard a Mooseker, 1981). Neustálé změny, kterými buňka prochází, se odrážejí v dynamice signalizačních drah a cytoskeletu. Přestavba cytoskeletu vyžaduje rychlou polymeraci a depolymeraci aktinových vláken (Ayscough a Drubin, 1996).

*De novo* skládání aktinového vlákna z monomerního aktinu je proces sestávající se ze tří menších fází. Vše začíná shlukováním tří monomerů, které tvoří nukleační centrum. Ve zkumavce je tato etapa nazývána „lag fází“, neboť je relativně pomalá. Druhá fáze

je označována jako prodlužování, kdy se G-aktin přidává k oběma koncům mikrofilament. Růst vlákna ustává ve třetí fázi - dynamické rovnováhy („steady state“), kdy přírůstek je roven úbytku monomerů. Délka vlákna tehdy zůstává konstantní (Frieden a Goddette, 1983).

### 3.1 Aktin vázající proteiny

Dynamika tvorby aktinových vláken je řízena prostřednictvím vazby s ABP (**A**ctin **b**inding **p**roteins). Pokusy klasifikovat ABP většinou končí neúspěchem, jelikož tato skupina má obrovský počet členů. Aktin vázající proteiny interagují buď přímo s aktinovými filamenti, nebo s monomerním G-aktinem a řídí dynamiku procesu. ABP, které se vážou na G-aktin, mohou (Winder a Ayscough, 2005):

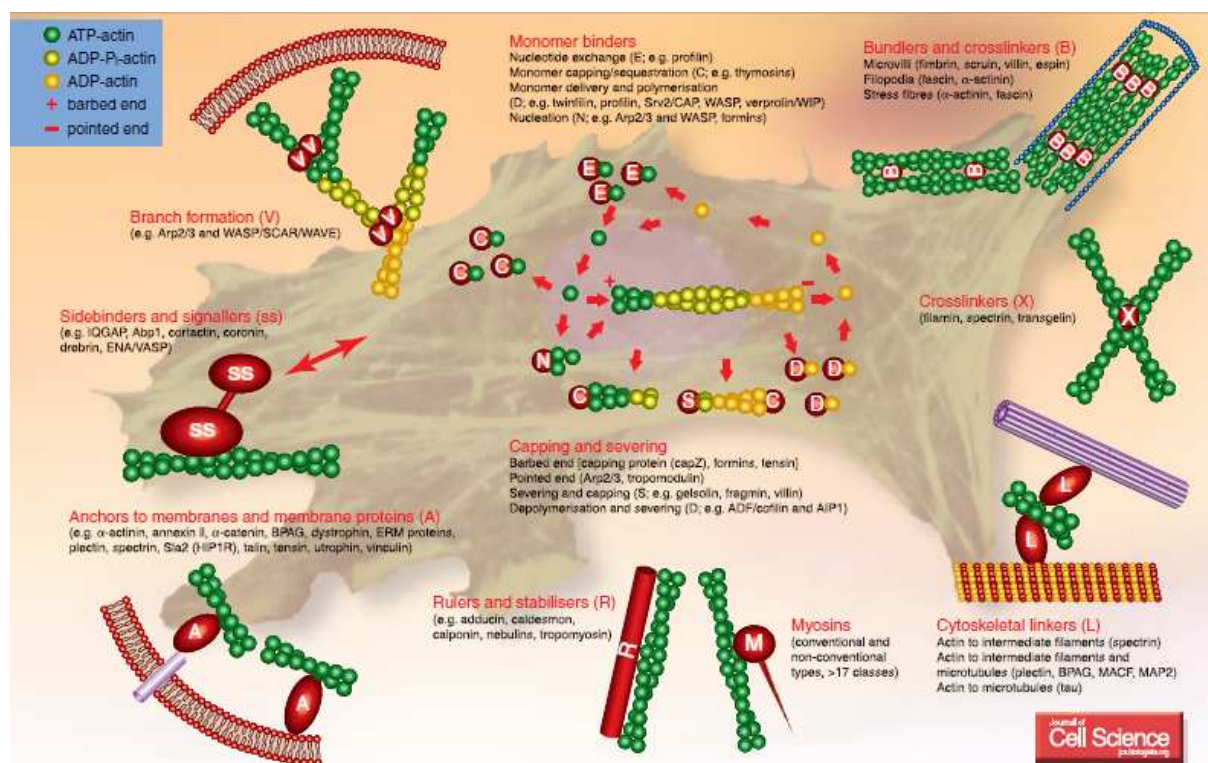
- ❖ interagovat s ADP-aktinem na koncích filament (např. twinlin, ADF)
- ❖ usnadňovat výměny ADP za ATP v molekule aktinu (např. CAP)
- ❖ stabilizovat, a tím usnadňovat proces polymerace aktinu (např. profilin, verprolin)

ABP účastnící se interakce s F-aktinem se dělí na pět skupin (Winder a Ayscough, 2005) (viz Obr. 2):

- ❖ myoziny
- ❖ aktin prokřížující a propojující proteiny (např. spectrin, filamin)
- ❖ svazkující proteiny (např.  $\alpha$ -aktinin)
- ❖ spojky mezi aktinem a ostatním cytoskeletem (tau, plektrin)
- ❖ spojky mezi aktinem a membránou (např. integrin, annexin)

Z variability ABP vyplývá, že mají různé schopnosti, jimiž dynamiku F-aktinu ovlivňují:

- ❖ Inhibují polymeraci F-aktinu stabilizací volných monomerů (např. thymosin) (Vancompernelle et al., 1992; Yarmola et al., 2000).
- ❖ Dezintegrují vlákno tím, že dokáží najít ADP na vlákně, navázat se na něj, změnit konformaci oblasti a vlákno přetrhnout (např. ADF (**a**ktin **d**epolymerizující **f**aktor), kofilin, katastrofin, gesolin a severin) (Okreglak a Drubin, 2007).
- ❖ Zahajují nebo podporují polymeraci různými způsoby. (Jedná se např. o Arp2/3 (**A**ctin **r**elated **p**rotein), profilin, Rho, Rac, čapkové proteiny, WASP (**W**iskott-**A**ldrich syndrom **p**rotein)) (Okreglak a Drubin, 2007).



Obr. 2 – Skupiny proteinů spolupracujících s aktinem nacházející se v buňce (Převzato z Winder a Ayscough, 2005).

K zajištění efektivní tvorby vláken buňka používá další nukleační faktory NPF (Nucleation promoting factors) (např. forminy). Forminy tvoří multidoménové struktury, které fungují jako dimery při nukleaci lineárních filament nebo jako elongační faktory. Proces začíná stabilizací nukleačního centra a poté forminy zůstávají součástí rostoucího konce vlákna. Tím zabraňují čapkujícím proteinům ukončit polymeraci (Firat-Karalar a Welch, 2011).

Regulační proteiny aktinu ovlivňují dynamiku aktinových vláken a hrají důležitou úlohu u savců i kvasinek (Robertson et al., 2009b).

## 4 Regulační domény ABP zapojených v CME

Proteiny účastníci se procesu regulace aktinu v CME obsahují konkrétní domény, které jim umožňují vykonávat jejich funkci (viz Obr. 3). Specifické domény umožňují časoprostorové zacílení regulačních proteinů, jejich správnou lokalizaci a následnou aktivaci nebo rekrutování dalších molekul, které jsou nutné pro správné provedení úlohy proteinu během klatrinové endocytózy. Nejdůležitější domény jsou ty, které mohou vázat aktin nebo plazmatickou membránu.



Následující domény jsou podstatné pro interakce jednotlivých proteinů s aktinem.

**Talin-like doména** se nachází v kvasinkových proteinech, kde propojuje aktinová vlákna a plazmatickou membránu, což umožňuje využití mechanické síly polymerujícího aktinu při vchlipování membrány. Je tvořena specifickým motivem aminokyselin I/LWEQ. Talin-like doména je součástí adaptorového proteinu Sla2, avšak přítomnost této domény není podmínkou k navázání Sla2 k aktinu (Wesp et al., 1997). **Talin doména** je součástí savčích ABP. V CME má obdobnou funkci jako talin-like doména (Jeng a Welch, 2001).

**VCA motiv** (verprolin-central-acidic) je součástí proteinové rodiny WASP. Zprostředkovává vazbu mezi nukleárními proteiny a Arp2/3 komplexem. Zajišťuje podporu nukleace. Skládá se z verprolinové, centrální a kyselé domény (Miki et al., 1998).

Centrální oblasti se vážou do hydrofobních míst aktinových monomerů. Konkrétní funkce této domény není známá. Nejpravděpodobněji váže volné aktinové monomery a při spolupráci s dalšími doménami tyto G-monomery zprostředkovává Arp2/3 komplexu (Veltman a Insall, 2010).

Kyselá doména není tak komplexní jako centrální oblast. Tato doména se váže specifickými aminokyselinami (hlavně tryptofanem) na rozhraní Arp2 a Arp3 podjednotek Arp2/3 komplexu, a tím napomáhá zahájení polymerace aktinu (Dominguez, 2009).

**WH2 doména** (WASP homology 2) je součástí výše zmíněného motivu VCA, proto je obsažena u většiny známých nukleárních faktorů kromě forminu. Může však existovat i samostatně. WH2 má afinitu k aktinovým monomerům. Tato část proteinu je poměrně krátká, tvoří ji přibližně 17 – 27 aminokyselin. Často se vyskytuje v tandemech i u proteinů, které nejsou zapojeny v procesu CME a na nukleaci aktinu se nepodílejí. Vždy se však váže k Arp2/3 komplexu (Dominguez, 2009).

Podstatnou úlohu v pozdní fázi CME hrají také domény, které se dokáží navázat na plazmatickou membránu.

**ANTH** a **ENTH** (AP180 N-terminální homologní doména, epsin N-terminální homologní doména, nazývána též epsinová doména) jsou součástí adaptorových proteinů. ANTH/ENTH se dokáže vázat k membráně buňky selektivně do míst, kde je obsažen fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát. Domény jsou tvořeny přibližně 150 aminokyselinami. Obvykle tuto doménu obsahuje protein, který má i aktin vazebnou doménu. Tím dochází k propojení plazmatické membrány a aktinových vláken. Navíc tato část proteinu interaguje s bílkovinami, které ovlivňují nukleaci a skládání klatrinového pláště (Legendre-Guillemain et al., 2004).

**EH doména** (**Eps15** **h**omology **d**omain) propojuje jednotlivé členy adaptorových proteinů a ostatních komponentů účastnících se první fáze endocytózy. Doména má afinitu k peptidům, které obsahují sekvenci aminokyselin Asp-Pro-Phe (**NPF motiv**). Je dlouhá přibližně 100 aminokyselin. U kvasinek tuto doménu obsahují adaptorové proteiny (např. Ent1, Ent2, Pan1, Sla1, yAP180A a yAP180), u savců epsin a Eps15 (Confalonieri a Di Fiore, 2002).

**BAR domény** (**B**in-**A**mphiphysin-**R**vs) a u savců **N-BAR** (**n**eural **B**AR) jsou označovány jako „senzory“ ohybu membrány. Díky tomu, že obsahují kladně nabitě zbytky aminokyselin, se tyto části proteinů snadno vážou na negativně nabitě fosfolipidy membrány, kde BAR domény ohýbají plazmatickou membránu (Ren et al., 2006). Účastní se procesu vytváření váčku. Jsou součástí proteinů, které se podílejí na odštěpování vzniklého váčku (např. amphiphysin, Rvs161, endophilin, SNX9) (Ren et al., 2006).

Mezi regulačními proteiny aktinu jsou zastoupeny také obecně rozšířené domény, které jsou důležité pro vznik správných proteinových interakcí. Příkladem je 50-70 aminokyselin dlouhá **SH3 doména** (**S**rc **h**omology **3**). Tuto doménu obsahují proteiny (např. dynaminy, epsiny, kortaktin, Abp1, Pan1), které ji využívají pro vazbu s interakčními partnery nezbytnými pro správný průběh endocytózy. Váže se přes místa, která jsou bohatá na prolinovou sekvenci Pro-X-X-Pro (McPherson, 1999).

## 5 Aktin a CME

Regulace aktinu je nejvíce prostudovaným procesem klatrinem zprostředkované endocytózy (Conner a Schmid, 2003). Význam pojmu „klatrinem zprostředkovaná endocytóza“ se dnes markantně odlišuje od dob, kdy bylo poprvé vizualizováno vychytávání materiálu v endocytóze pomocí klatrinových váčků Rothem a Porterem (Roth a Porter, 1964).

Tehdy byl termín CME téměř synonymem pro receptorem zprostředkovanou endocytózu - RME (**R**eceptor **m**ediated **e**ndocytosis). Nelze popřít, že buňky vychytávají širokou škálu ligandů (např. LDL částic (**l**ow **d**ensity **l**ipoprotein), transferrinu, růstových faktorů a protilátek) pomocí různorodých receptorů a adaptorových proteinů (např. AP-2 – **A**daptor **p**rotein 2) (Roth, 2006).

Obecný mechanismus CME je poměrně jednoduchý. Klatrinem pokryté jamky na plazmatické membráně navazují na receptory příslušný náklad, vchlipují se a následně odškrcují pomocí dalších proteinů. Odškrcené váčky se přemísťují uvnitř buňky. Aby mohly váčky splynout s časným endozómem nebo doručit náklad do cílového kompartmentu,

musí se zbavit klatrinového pláště, což mohou uskutečnit pomocí auxilinu nebo hsc70 (Doherty a McMahon, 2009).

Jedním z argumentů proč regulaci aktinu studovat během klatrinové endocytózy je, že probíhá ve většině savčích buněk. Druhým důvodem je vhodný modelový organismus *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka je využívána pro svou přebujelou homologní rekombinaci, snadné pěstování, dvouhybridový systém, poměrně snadnou přípravu mutantů a dostatek markerů, které v současnosti zjednodušují výzkum CME (Conner a Schmid, 2003).

Sítě mikrofilament v CME jsou studovány na kvasince zhruba 20 let (Adams a Pringle, 1984). Za toto období bylo u kvasinky popsáno více jak 60 proteinů, které mají funkci v internalizačním procesu a v interakcích membránových váčků s aktinem. V současné době se také provádí velké množství pokusů na savčích buněčných liniích, což je technicky náročnější (Kaksonen et al., 2005).

Pro potřebu přehlednosti uvádím regulační proteiny aktinu u modelových organismů následujícím způsobem: kvasinkový protein / savčí homolog (např. Sla2 / Hip1R). Komplexy proteinů uvádím s lomítkem bez mezery (např. Myo5/Vrp1).

Většinou můžeme aktin během CME pozorovat ve svazcích nebo sítích rozložených nejčastěji těsně pod plazmatickou membránou (Kaksonen et al., 2003). Předpokládá se, že aktinový cytoskelet kvasinek slouží jako „přístaviště“ pro příslušné proteiny účastnící se CME (Qualmann et al., 2000).

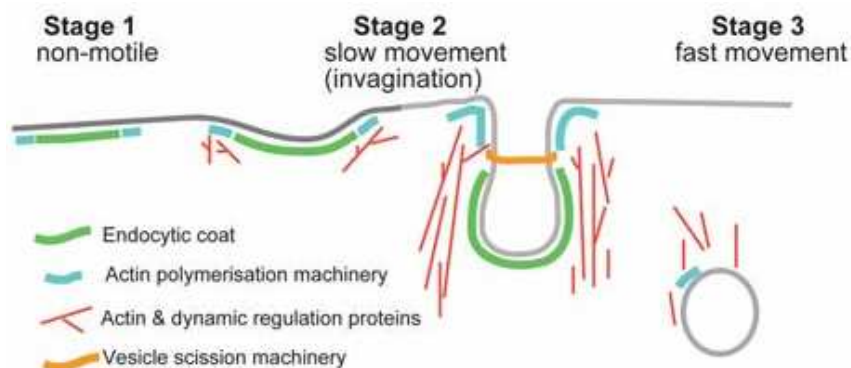
Úloha regulace aktinu v endocytóze kvasinek zahrnuje tři fáze (viz Obr. 4) (Kaksonen et al., 2003, 2005; Kim et al., 2006):

1. nepohybující se fáze – začíná se skládat plášť na membráně, hromadí se iniciační proteiny, které jsou zatím neaktivní
2. pomalá pohybující se fáze – období, kdy aktin polymeruje a vytváří se konstrukce nezbytná pro vchlipování váčku
3. rychle se pohybující fáze – dochází k odštěpení váčku a k jeho přesunu uvnitř buňky

Aktin u kvasinky hraje roli ve 2. a 3. fázi endocytózy, ale neúčastní se vymezení oblasti endocytózy. Zapojuje se až při ustavení komplexu plášťových proteinů (coat complex). Během invaginace bývá využita aktinová polymerační mašinérie ke generování síly potřebné pro vchlípení membrány (actin network grove machinery). Dále se procesu formování váčku účastní vezikulární štěpící proteiny, které napomáhají odštěpení váčku od plazmatické membrány (scission modul) a velice důležitý je regulační aparát,



který zajišťuje řízení aktinové dynamiky (the actin and dynamic regulation) (Kaksonen et al., 2005, 2003).



Obr. 4 – Schéma popisující fáze CME u kvasinky (Převzato z Robertson et al., 2009b).

V případě savčího modelu jsou obdobně jako u kvasinek charakterizovány tři fáze CME. Zapojení aktinu se v jednotlivých fázích CME od kvasinek liší v závislosti na nákladu uvnitř váčku či typu buňky a určitou roli hraje i způsob odštěpení a translokace váčku. V současné době pro výzkum dynamiky ABP a dalších proteinů ovlivňujících procesy endocytózy existuje trend, který volí jemnější dělení, a to do pěti až osmi fází (Liu et al., 2009; Taylor et al., 2011).

Pro snazší pochopení dynamiky CME bylo stanoveno v roce 2009 dělení proteinů, o němž si myslím, že je přehledné a dobře osvětluje problematiku chování molekul během klatrinové endocytózy. Proteiny, které se savčího i kvasinkového modelu účastní, jsou rozdělené dle (Liu et al., 2010, 2009) do pěti skupin: plášťové proteiny, aktin/myozin I, BDP (**BAR domain proteins**), PIP2 (**f**osfatidylinositol-4,5-**bis**fosfát) a fosfatázy fosfatidylinositolu.

U kvasinek se nejprve hromadí plášťové proteiny, PIP2, nukleární faktory a další komponenty v místě jamky. Následuje elongace aktinových vláken, navíc aktivita motorové domény myozinu s mikrofilamenty generuje mechanickou sílu, která deformuje membránu a vytváří různě dlouhý krček. BDP chrání krček váčku před předčasným odštěpením. Zakřivená membrána aktivuje fosfatázu PIP2. Poté dochází k hydrolyze PIP2. Čím více se PIP2 hydrolyzuje, tím lépe se membrána krčku váčku zaškrtní (Liu et al., 2009).

U savčích buněk se aktinová vlákna podílejí na procesu CME až v polovině druhé a první části třetí fáze modelu. Navíc se narozdíl od kvasinek na odštěpení váčku podílí dynamin, po jehož rozložení dochází k odpoutání váčku od membrány. Zajímavé je, že pokud by došlo k zvýšení aktinové polymerace a neodpoutání dynaminu, váček se neodštěpí, protože aktinová vlákna budou vytvářet tlak proti odštěpovací síle (Liu et al., 2009).



## 5.1 Odlišnosti savčího a kvasinkového modelu v průběhu klatrinové endocytózy

Dynamika a celkový význam, v jakém jsou aktinová vlákna využívána v CME, se u savčích buněk a kvasinek liší. Klatrinová endocytóza *S. cerevisiae* nefunguje bez aktinového cytoskeletu. Aktinová polymerace umožňuje řídit vchlipování, zužování spojení mezi váčkem a membránou a samotné odštěpení váčku. Ačkoliv u savčích buněk je aktinový cytoskelet podmínkou pro správné fungování endocytózy (např. fagocytózy, makropinocytózy, caveolinové endocytózy), při CME pravděpodobně není vždy nutný. Během odštěpování je využíváno vysokého osmotického tlaku v buňce nebo GTPázy dynaminu (Liu et al., 2009). V případě kvasinek je popsáno skládání aktinu v časných fázích formování váčku (Kaksonen et al., 2003), což může stabilizovat počáteční vchlipování jamek, zatímco u savčích buněčných linií panují rozpory a většina vědců se přiklání k názoru, že se aktin v časných fázích formování klatrinového váčku neobjevuje. Nicméně působení aktinu je potvrzeno v pozdějších fázích endocytózy (např. invaginaci) (Conibear, 2010).

Další odlišností mezi kvasinkami a savčími buňkami v CME je využití klatrinu. Na rozdíl od savců se kvasinkový klatrin nachází jen v distální části váčku. Funkce kvasinkového klatrinu v CME je specifická, protože kortikální tečky („patch“ neboli aktinová struktura, kde dochází k hromadění aktinu během endocytózy (Kilmartin a Adams, 1984; Adams a Pringle, 1984)) nejsou považovány za srovnatelné s plášťovou strukturou u savčích buněk (Conibear, 2010).

Zajímavé je pozorovat vliv fyzikálních vlastností savčí a kvasinkové membrány na využití regulačních proteinů během CME. Odlišná tenze na membráně specificky ovlivňuje proces při odškrcení váčku (Merrifield, 2004). Buněčná stěna kvasinek taktéž přispívá k vytváření většího napětí proti membráně. Z toho plyne, že kvasinky musí vynaložit větší sílu, aby se váček zformoval a odštěpil (Aghamohammadzadeh a Ayscough, 2009). Myslím si, že i to může být jedním z důvodů častějšího využití aktinu v CME u kvasinek.

V případě kvasinky byly v rámci jedné buňky nalezeny rozdíly v počtech endocytovaných váčků během CME v závislosti na stáří buňky. Více endocytují mladé dceřiné pupeny, což znamená, že více používají aktin. Jedním z důvodů může být potřeba rychle růst a recyklovat molekuly potřebné pro metabolismus (Kaksonen et al., 2003). Je zajímavé, že na tvar váčku u savců i kvasinek má značný vliv, pokud je buňka přichycena k podkladu. Stejně tak různé klatrinové struktury specificky ovlivňují dynamiku polymerace aktinu skrze formování klatrinového pláště. (Kirchhausen, 2009; Liu et al., 2006).

Savčí modely aktinovou polymeraci převážně nepoužívají v součinnosti s dynaminem při odštěpení budoucího váčku, jako je tomu u kvasinek (Ramachandran, 2011). V současné době je dynamin chápán jako součást pozitivní zpětné vazby, která ovlivňuje změny tvaru membrány (Conibear, 2010; Liu et al., 2006, 2009, 2010).

## **6 Regulace aktinu v CME**

Každá etapa regulace aktinu během klatrinové endocytózy je řízena signály a interakcemi aktinu s různými skupinami proteinů. U savčích i kvasinkových buněk existují podobné proteiny vykonávající stejnou funkci. Jednotlivé skupiny regulačních proteinů se tedy dají rozdělit podle funkce (viz Příloha č. 1). Jak je vidět z tabulky (viz Příloha č. 1), některé proteiny mají více funkcí, přesto je lze klasifikovat do robustnějších celků:

1. plášťové proteiny ovlivňující nepřímo aktin a adaptorové proteiny
2. proteiny aktinové nukleace
3. regulační proteiny vláken aktinu
4. ostatní proteiny

### **6.1 Regulace aktinové nukleace při interakci s plášťovým komplexem a membránou**

Nukleace aktinu může být zahájena až po sestavení plášťového komplexu v místě budoucího odškrcení váčku. Plášť ovlivňuje invaginační proces endocytózy a zajišťuje vychytávání nákladu, navíc je důležitý pro iniciaci polymerace aktinových vláken (Smythe a Ayscough, 2006).

Významnou molekulou plášťového komplexu je klatrin. Jeho funkcí je vytvářet z triskelionů síť kolem formujícího se váčku (Kirchhausen, 2009).

Součástí plášťového komplexu je skupina Ent1 a Ent2 / epsinů. Tyto proteiny jsou schopny interagovat s lipidovými strukturami membrány, konkrétně s PIP2, taktéž se současně mohou vázat k nukleacním proteinům, klatrinu a adaptorovým proteinům, jako je kvasinkový adaptorový protein Ede1. Adaptor Ede1 kromě výše zmíněných interakcí váže současně ubiquitinové motivy, které jsou důležité pro zprostředkování endocytózy (Aguilar et al., 2003; Gagny et al., 2000). Ubiquitin není pouze molekulou, která zajišťuje degradaci proteinů, v CME totiž funguje jako spouštěcí impuls k internalizaci váčku.

Třetí skupinu proteinů plášťového komplexu kvasinky tvoří bílkoviny Sla1 / komplex CD2AP/CIN85, Sla2 / Hip1R a Pan1 / Eps15. Tyto proteiny mají mnohonásobné interakční domény, kterými se dokáží vázat k membráně a současně ke svým specifickým partnerům. Sla2 / Hip1R je významnou molekulou pro regulaci aktinové polymerace, protože se váže

současně na klatrin a aktin. Pan1 / Eps15 je aktivátorem Arp2/3 komplexu, konkrétní mechanismus aktivace však není znám. Nepřímý vliv na proces regulace aktinu má adaptor Sla1, který se specificky váže k proteinům zajišťujícím endocytózu. Sla1 inhibuje funkci některých nukleárních faktorů (Gourlay et al., 2003; Newpher et al., 2005; Costa a Ayscough, 2005; Warren et al., 2002).

V roce 2006 bylo prokázáno, že pro správný průběh první fáze endocytózy je nutný aktin (Kim et al., 2006). Já osobně se přikláním k názoru oponentů, že lokalizace plášťového komplexu je nezávislá na aktinu (Robertson et al., 2009b), protože funkce a správný průběh umístění proteinů asociujících s membránou v budoucím místě váčku není ovlivněna při poškození aktinového cytoskeletu (Ayscough et al., 1997). Obě strany se v každém případě shodují, že rozklad plášťového komplexu na aktinu závisí (Sirotkin et al., 2010).

Nukleace aktinu se účastní desítky molekul. Může probíhat *de novo* nebo na polymerujících vláknech, což způsobí rozvětňování aktinové sítě. Taktéž lze tento proces uskutečnit na odčepičkovaných vláknech (Winder a Ayscough, 2005). Jakmile je zahájeno skládání filamenta, jeho rychlost musí být omezena natolik, aby nedošlo k nadměrné polymeraci, a tím poruše endocytózy u kvasinek. Důvodem vzniku defektu bývá nejčastěji vyčerpání aktinu, což omezí další kolo endocytózy (Ayscough et al., 1997; Yarar et al., 2005).

V procesu klatrinové endocytózy hraje podstatnou roli při iniciaci nukleace evolučně stará a konzervovaná rodina WASP (Veltman a Insall, 2010). WASP proteiny ovlivňují iniciaci polymerace aktinu tím, že zvyšují aktivitu Arp2/3 komplexu. Tento protein se u kvasinek skládá ze sedmi podjednotek. Nejdůležitějšími podjednotkami, podle kterých je celý komplex pojmenován, jsou Arp2 a Arp3. Komplex je konzervován i u savčího modelu. Arp2/3 komplex dokáže nukleovat a rozvětňovat aktinová vlákna. Sám o sobě bez aktivace má nižší polymerační aktivitu. Jeho interakce s dalšími proteiny a regulace těchto vazeb je velmi složitá. Existuje několik obecných hypotéz o tom, jakým způsobem Arp2/3 nukleuje budoucí aktinová vlákna. Na téma aktivace Arp2/3 komplexu v klatrinové endocytóze doposud nebylo nic publikováno. Předpokládá se, že pro Arp2/3 komplex v procesu endocytózy platí jeden z obecných modelů (Le Clainche et al., 2003; Pollard, 2007; Robinson et al., 2001).

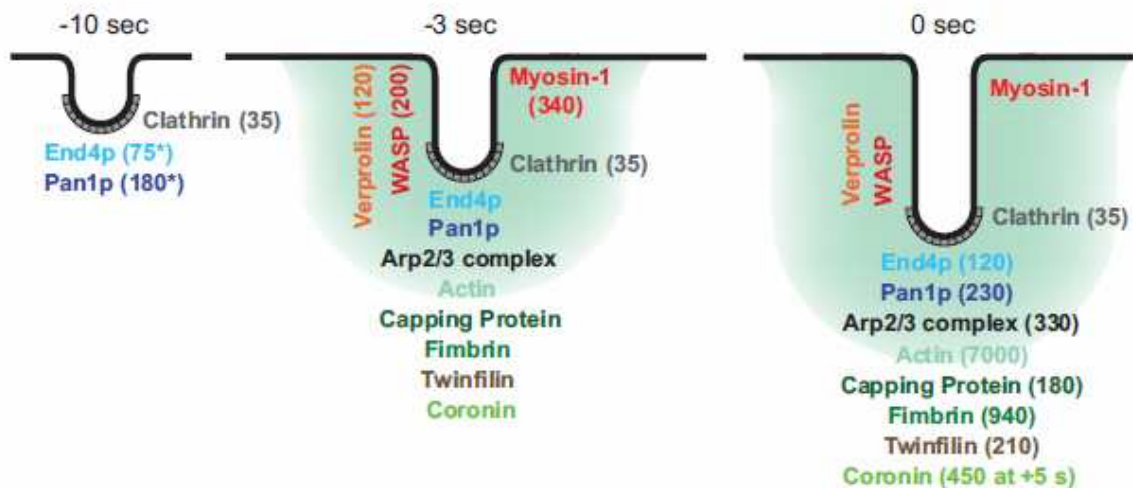
Nukleaci v endocytóze výrazně ovlivňují NPF, často označované jako aktinová polymerační mašinerie. Jejich funkcí je ovlivňovat iniciaci aktinových vláken. Dodávají G-monomery na již existující vlákna, mohou soutěžit o místo s inhibitory aktinu a jednotlivé proteiny jsou schopny vzájemných interakcí. Do kategorie NPF v průběhu CME jsou zařazeny proteiny Las17 / WASP, kortaktin, Pan1 / Eps15, Abp1 / mAbp1, Myo3 a Myo5 /

Myoziny typu I, Vrp1 / WIP. Každý z nich se stává součástí procesu v odlišných fázích maturace klatrinových jamek. Mechanismy a funkce nukleačních faktorů jsou specifické a míra schopnosti vázat se k Arp2/3 se liší mezi jednotlivými členy aktinové polymerační mašinérie. Las17 a komplex Myo5/Vrp1 mají vzhledem k Pan1 a Abp1 vyšší NPF aktivitu (D'Agostino a Goode, 2005; Sun et al., 2006). NPF aktivita také záleží na poměru zastoupení jednotlivých nukleačních proteinů v místě endocytózy. Obr. 5 dokládá schématicky účinnost NPF aktivity v závislosti na množství jednotlivých kvasinkových proteinů regulujících aktin v klatrinové endocytóze (Sirotkin et al., 2010).

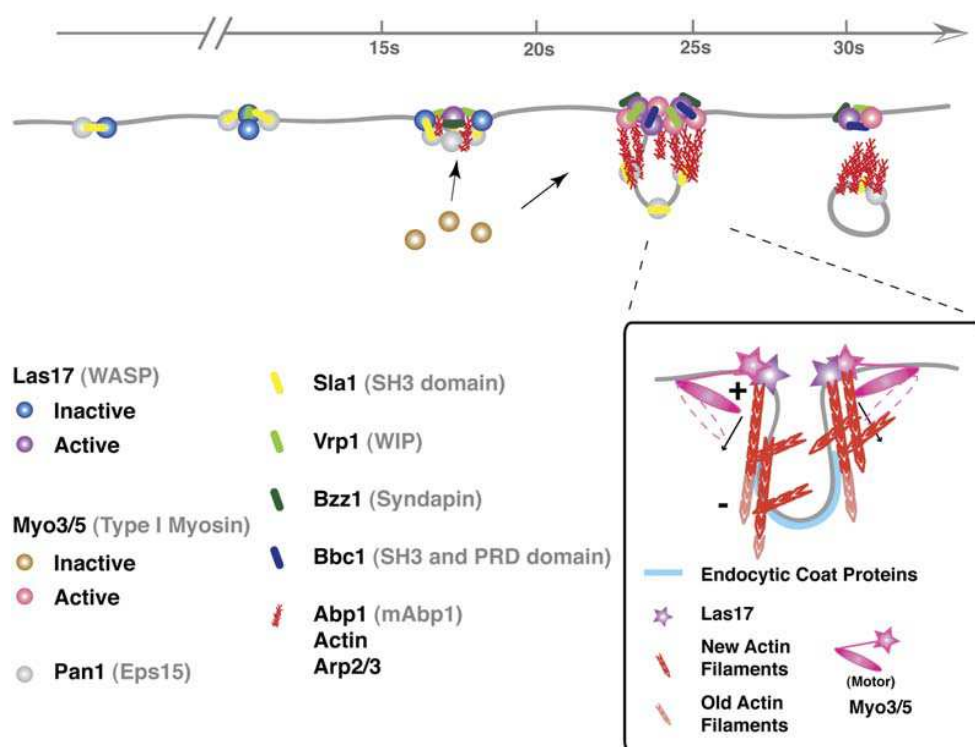
I přes odlišné chování a časoprostorovou lokalizaci jsou svou funkcí NPF navzájem redundantní. Některé NPF jsou umístěny do místa endocytózy dříve, zbytek je lokalizován současně se zahájením iniciace skládání aktinu (Sun et al., 2006) (viz Obr. 6). Aktivaci Arp2/3 komplexu většina nukleačních faktorů provádí skrze VCA motiv. Všechny NPF obsahují domény významné pro endocytózu, přes které se vážou k proteinům lokalizovaným na membráně (Jeng a Welch, 2001).

Po dokončení nukleace budoucích aktinových vláken nastává přípravná fáze na invaginaci. Aktinová filamenta vážou plášťové proteiny budoucího váčku a vytváří pod membránou trychtýř propojených vláken, který je schopen řídit invaginaci a tlačit membránu váčku směrem od plazmatické membrány dovnitř buňky. Vliv na proces aktinové polymerace mají proteiny mezi pláštěm a polymerujícím aktinem (např. Sla2 / Hip1R, Pan1 / Eps15), které jsou ovlivňovány dalšími interakcemi (Mulholland et al., 1994).

Je nutné zdůraznit, že regulace aktinu se účastní obrovské množství proteinů, které jistě ovlivňují funkce hlavních molekul celé regulace. Vybrané interakce proteinů uvádím (viz Příloha č. 2). Podrobnější charakteristice konzervovaných proteinů se věnuji v následujících podkapitolách.



Obr. 5 – Schématický model popisující množství zastoupených proteinů v průběhu invaginace budoucího váčku (Převzato z Sirotkin et al., 2010).



Obr. 6 - Model skládání komponentů účastnících se nukleace u kvasinky  
Zhruba 20s před zahájením nukleace je do endocytického místa umístěn Las17, zpočátku je udržován v neaktivním stavu (např. pomocí Sla1 a dalších proteinů). Následně jsou umístěny téměř současně Vrp1 a Bzz1. Bzz1 přes SH3 doménu zmírňuje inhibici Las17. Funkcí Vrp1 je rekrutovat Myo5, který dokáže v součinnosti Vrp1 napomáhat aktivaci nukleace po níž následuje polymerace. Pozitivně proces invaginace a polymerace váčku ovlivňuje Bbc1, který pomáhá aktivovat NPF aktivitu Las17 a prodlužuje tedy trvání polymerace a pohybu váčku (do lumen buňky) (Převzato z Sun et al., 2006).

### 6.1.1 Adaptorové proteiny v CME

Na rozhraní aktinu a pláště jsou situovány důležité proteiny, které fyzicky propojují plášťovou mašinerii s aktinovým cytoskeletem a membránou. Mezi proteiny, které jsou významné pro spojení klatrinem pokrytých váčků a F-aktinu, patří Sla2 / Hip1R a Sla1 / CD2AP/CIN85 komplex (Engqvist-Goldstein a Drubin, 2003).

#### Sla2 / Hip1R

Savčí Hip1R neboli kvasinkový Sla2 je hypotetickým spojníkem mezi váčkem a aktinovými vlákny. Proteiny spadající do rodiny Huntington interagujících proteinů nepřímo ovlivňují polymeraci vláken a invaginaci váčku. Hip1R se specificky váže přes své domény ke klatrinu a skrz ANTH doménu k fosfoinositidům.

Sla2 také obsahuje na N-konci důležitou ENTH doménu, která mu umožňuje vazbu k PIP2 na plazmatické membráně (Itoh et al., 2001; Lengsfeld et al., 1974; Legendre-Guillemain et al., 2004). C-konec proteinu obsahuje aktin vazebnou doménu, jenž má funkci odštěpovat klatrinové váčky během CME (Engqvist-Goldstein et al., 1999)

#### Sla1 / komplex CD2AP/CIN85

Sla1 je kvasinkový adaptorový protein. Propojuje proteiny aktinové polymerační mašinerie s komponenty endocytické mašinerie. Účastní se nepohyblivé fáze endocytózy a třetí fáze se již neúčastní. Funkcí tohoto adaptoru je vázat se na Las17 a inhibovat tím tento klíčový nukleární protein, což negativně ovlivňuje Arp2/3 komplex (Rodal et al., 2003; Warren et al., 2002). Pokud je Sla1 fosforylován specifickou kinázou, nemůže se vázat na Las17 a inaktivovat tím jeho funkci. Fosforylace Sla1 vede v důsledku k jednodušší iniciaci polymerace aktinu pod membránou, avšak nemusí způsobit zvýšení polymerace aktinu (Fazi et al., 2002; Zeng et al., 2001).

Savčí komplex CD2AP/CIN85 má v CME podobnou funkci jako Sla1. Primární funkce jednotlivých proteinů je však specifická, CIN85 se váže k proteinům plášťového komplexu a fosfatázám (Dikic, 2002). CD2AP interaguje s kortaktinem a aktinem, dokáže *in vitro* inhibovat aktivitu „capping proteinů“, což vede k prodloužení vláken pod membránou. Z toho plyne, že nepřímo reguluje polymeraci aktinu. V *in vivo* případě není znám dopad na polymeraci aktinu pod membránou (Bruck et al., 2006).

### 6.2 NPF

Obecně je předpokládána vzájemná interakce NPF a proteinů Arp2/3 komplexu, která má vliv na uspořádání inaktivního shluku jednotlivých podjednotek Arp2/3. Interakce vyvolá

konformační změny a aktivaci komplexu, tím pádem iniciaci polymerace mikrofilament (Le Clainche et al., 2003).

### 6.2.1 Las17 / WASP

Kvasinkový protein Las17 je členem WASP rodiny. Tento nukleační faktor je považován za hlavní aktivátor Arp2/3 komplexu. Další jeho funkcí je interagovat s komponenty nukleační mašinerie a zprostředkovat polymeraci aktinu. Váže pouze aktinové G-monomery.

Las17 je lokalizován na membránu jako neaktivní v prvních 10-20s nukleační fáze CME (Thanabalu et al., 2007). Aktivita Las17 je na počátku nepohyblivé fáze inhibována proteinem Sla1. Přesný mechanismus není znám. Existují dvě domněnky o aktivaci Las17 a následné polymeraci aktinu. Za prvé je NPF funkce Las17 aktivní až po odloučení Sla1. Za druhé *in vitro* studie popisují inaktivaci Sla1 pomocí specifického poměru proteinu Bbc1 (Sun et al., 2006). Správnou funkci Las17 ovlivňují také proteiny plášťového komplexu.

Z hlediska polymerace aktinu a invaginace váčku je významná interakce s komplexem Myo5/Vrp1. Vzájemná interakce s komplexem Myo5/Vrp1 zvyšuje jeho NPF aktivitu a chrání Las17 před degradací.

V poslední době byly vydány články popisující ovlivnění funkce Las17 skrze aktin vazebný protein Ysc84. Podle modelu vytváří Ysc84 ternární komplex s Las17 a usnadňuje mu interakci s aktinovými monomery (Robertson et al., 2009a).

Mezi členy WASP rodiny patří savčí homolog WASP. Ten je schopný aktivovat Arp2/3 komplex. Jeho role v CME je vytvářet vazbu s dynaminem a interagovat se savčími NPF (Merrifield et al., 2004).

### 6.2.2 Myo3 a Myo5 / myoziny typu I

Myo3 a Myo5 se řadí mezi nesvalové molekulární myoziny. Do stejné skupiny spadá i savčí obdoba těchto proteinů - myozin typu I. Většina doposud známých studií se zabývá kvasinkovými myoziny, následující informace se tedy vztahují k Myo3 a Myo5.

Ze struktury myozinu vyplývá, že má dvě rozdílné aktivity – motorovou a nukleační. Tyto aktivity jsou oddělitelné, což znamená, že narušení motorové části proteinu nemá signifikantní vliv na polymeraci aktinu pod membránou. V případě narušení nukleační aktivity nedojde k porušení invaginační funkce, neboť invaginace membrány váčku se účastní motorová část proteinu (Sun et al., 2006).

Myo3 a Myo5 jsou významné při regulaci aktinu v CME, protože kontrolují růst aktinových sítí a nukleují vlákna pomocí interakce s Arp2/3 komplexem

(Evangelista et al., 2000). NPF funkce myozinů je regulována interakcí s Vrp1, což prodlužuje čas, po který je myozin aktivní během druhé fáze endocytózy. To se projeví prodloužením doby polymerace aktinu, což může do určité míry usnadňovat proces vchlipování váčku (Sun et al., 2006). Myoziny spolupracují na nukleaci také s proteiny Bbc1, Abp1, Pan1 a koronin (Kaksonen et al., 2005).

### 6.2.3 Ostatní NPF

Do této skupiny patří proteiny, které napomáhají klíčovým nukleacním molekulám v jejich funkci. Bez jejich přítomnosti by nukleace aktinových vláken byla narušena. Samy o sobě mají tyto proteiny slabší nukleacní aktivitu než Myo5 a Las17 (Sun et al., 2006).

Kvasinkový Abp1 (**A**ctin **b**inding **p**rotein **1**) se dokáže vázat na F-aktin skrze adaptory. *In vitro* savčí homolog Abp1 váže dynamin, čímž ovlivňuje nepřímo invaginaci váčku. Abp1 / mAbp1 přichází do místa endocytózy až po nasednutí myozinů na membránu (Kaksonen et al., 2005). Abp1 přivádí do místa endocytózy specifické kinázy, které fosforylují další členy NPF, což způsobuje terminaci aktinových vláken a rozrušení plášťového komplexu.

Pan1 je jedním z kvasinkových nukleacních faktorů. Tento protein je rekrutován společně s Las17 před příchodem Arp2/3 komplexu v druhé fázi CME. Váže se na adaptorové proteiny. Pokud je fosforylován, dojde k rozpadu plášťového komplexu. Defosforylace (specifickou fosfatázou) Pan1 obnovuje jeho NPF aktivitu. Savčí homolog Eps15 je spíše adaptorovým proteinem a nepřímo ovlivňuje nukleaci Arp2/3 komplexu (Taylor et al., 2011).

Kortaktin je savčí protein. Jeho úloha spočívá v účinném vázání a aktivaci Arp2/3 komplexu, což pozitivně ovlivňuje dynamiku aktinových filament během formování váčku (Zhu et al. 2005). Experimentálně je potvrzeno, že váže F-aktin a dynamin. Fosforylace kortaktinu Src kinázou zvyšuje asociaci kortaktinu s dynaminem (Zhu et al., 2007), čímž usnadňuje proces odštěpování váčku.

## 6.3 Regulační proteiny aktinové polymerace

Regulační proteiny aktinové polymerace v CME tvoří důležitou součást celého regulačního procesu aktinu a ovlivňují jeho organizaci i dynamiku. Lokalizace regulačních proteinů je závislá na rozmístění aktinu pod membránou váčku. Aktin během procesu CME prochází přeměnou ve vlákna nebo další složitější struktury, proto jsou v buňkách důležité proteiny, které jsou schopné větvit filamentární aktin či dokonce vytvářet aktinové sítě propojováním vláken (např. Sac6 / fimbrin) (Goode et al., 2001). Významnými členy jsou F-aktin stabilizující proteiny, do nichž patří čapkové proteiny (Amatruda et al., 1990).



Pomocí stabilizačních proteinů F-aktinu buňky dokáží regulovat délku aktinových vláken. Byly popsány dva obecně platné mechanismy:

1. Podle testů se zdá, že nadmíra PIP2 má inhibiční vliv na „capping“ proteiny. Narušení stabilizační funkce čapkových proteinů umožní buňkám vytvářet dlouhá vlákna (Moseley a Goode, 2006; Schafer et al., 1996).
2. Vazba forminů na plus konec aktinového vlákna stabilizuje a současně chrání před nasednutím čapkovacího proteinu (Firat-Karalar a Welch, 2011).

Ráda bych zmínila, že existuje možnost regulace aktinové polymerace některými jedy a léčivými. Tyto chemikálie jsou často využívány při výzkumu problematiky, ale z hlediska přirozeného zastoupení v buňce do této kapitoly nepatří. V poslední době se ukazuje zapojení regulačních proteinů endocytózy i v dalších buněčných procesech, jako jsou apoptóza, asymetrické dělení buněk nebo určení buněčné polarity.

### **6.3.1 Capping proteiny (čapkové proteiny)**

Čapkové proteiny jsou cytoskeletální proteiny, které se vážou na plus konec aktinových vláken. U kvasinky byl charakterizován capping protein kódovaný dvěma geny – CAP1 a CAP2, jejichž produkty tvoří heterodimerní komplex ve tvaru „čapky“ na plus konci aktinových vláken (Kim et al., 2004). Savčími homology jsou proteiny Cap $\alpha$  a Cap $\beta$ , které tvoří heterodimer nazývaný CapZ (Amatruda et al., 1990). Zatím však nebyly blíže studovány.

„Capping proteiny“ zabráňují přidávání dalších monomerů na nově syntetizovaná vlákna, ukončují růst vláken u kortexu buňky, a tím usnadňují jejich uchycení (Kim et al., 2006). Aktinová vlákna jsou jimi stabilizována po celou dobu svého trvání (Smythe a Ayscough, 2006).

Delece genu čapkovacího proteinu významně snižuje poměr pohybů při vchlípení váčku u kvasinky, což v důsledku prodlužuje druhou fázi endocytózy. Poslední studie ukazují, že čapkové proteiny hrají důležitou roli při polymeraci aktinu a usnadňují pomalou pohybující se fázi endocytózy (Kaksonen et al., 2005).

### **6.3.2 Aktin depolymerizující faktor ADF / kofilin**

V CME jsou ADF a kofiliny zahrnovány do rodiny remodelující aktin (Maciver a Hussey, 2002). Tyto proteiny specificky depolymerují aktinová vlákna na internalizovaných váčcích.

Savčí proteiny kofiliny přetrhávají aktinová vlákna. Nově vzniklé nestabilizované a nechráněné konce vláken začnou depolymerovat, čím se celkově zvyšuje rychlost, jakou G-monomery opouští konec vlákna, což následně způsobí rychlejší obrát aktinu v buňce.

Podstatné je, že ADF u kvasinek a kofilin u savců řídí poměr mezi monomery aktinu a F-aktinem, udržují dostatečné množství volných monomerů pro tvorbu nových aktinových sítí. Díky odstranění aktinu z internalizovaných kompartmentů se může proces endocytózy opakovat na témže místě znovu (Okreglak a Drubin, 2007). Kofilin se přednostně váže na ADP aktinové podjednotky, kde dochází k torzi. Tím se oslabí vzájemné vazby aktinových monomerů, což vede k rychlejšímu uvolnění fosfátu z ADP, a tím k rozložení starých vláken (Andrianantoandro a Pollard, 2006).

### **6.3.3 Svazující proteiny**

Úlohou kvasinkového Sac6 i savčího fimbrinu v klatrinové endocytóze je svazkovat jednotlivá vlákna, čímž se zvyšuje pevnost aktinových vláken. To následně umožňuje vchlipovat membránu větší silou (Kübler a Riezman, 1993).

Sac6 není jediným svazujícím proteinem působícím v aktinových tečkách, podobnou funkci má kvasinkový Scp1 / transgelin, který svazuje vlákna aktinu v poslední fázi endocytózy (Winder et al., 2003). Pokud chybí Sac6, destabilizuje se aktinová struktura pod membránou (Winder et al., 2003). Dalšími studiemi bylo zjištěno, že odstranění Scp1 může být kompenzováno nadměrnou expresí Sac6, a naopak, což by ukazovalo, že tyto dva proteiny jsou částečně redundantní (Gheorghe et al., 2008).

Fimbrin propouje jednotlivé svazky těsněji než jiné svazující proteiny, jelikož je poměrně malý. Dokáže modulovat vlákna aktinu pod membránou v závislosti na odpovědi druhých posílů (např. vápníku). V savčích buňkách je fimbrin primárně využíván při tvorbě lamelopodií (Bretscher, 1981).

## **6.4 Regulační proteiny aktinu při odštěpení váčku**

Po invaginaci budoucího váčku následuje odštěpení, což je proces, kdy se vezikl pohybuje směrem do lumen buňky. Dynamika, mechanismy a konkrétní vazby na proteiny, které aktin v tomto stádiu využívá, nebyly prozatím dostatečně popsány.

Odštěpení váčku u kvasinek zajišťuje odštěpovací komplex, kam patří Rvs161 a Rvs167. Dále komplex obsahuje BDP, PIP2, aktin, plášťové proteiny a PIP2 fosfatázu (Liu et al., 2010). Některé studie navíc předpokládají spolupráci myozinu typu I s vezikulárním odštěpovacím komplexem (Evangelista et al., 2000; Idrissi et al., 2008; Sun et al., 2006). Vezikulární odštěpovací komplex je schopný vázat mnoho dalších známých

molekulárních hráčů účastnících se endocytózy (např. Las17, Sla1, Sla2, Myo5). Ve specifickou dobu jsou Rvs167, Rvs161 vázány svými BAR doménami na membránu budoucího váčku a bylo potvrzeno, že zatím neznámým mechanismem dokáží asociovat s aktinovými vlákny. Aktinová vlákna jsou umístěna tak, aby napomohla pohybu membrány, což vyžaduje řádně fungující rozvětvenou aktinovou síť a správnou funkci stabilizujících a svazkujících proteinů (Galletta et al., 2010). Dosud však nebylo popsáno, zda se odštěpovací komplex váže k aktinovým vláknům přímo nebo pomocí adaptorů. Pokud je odštěpovací komplex narušen či zcela chybí, nedochází k odštěpení ani internalizaci vytvářejícího se váčku.

U savců je pro správný průběh odštěpení váčku důležitý dynamin. Současné studie prokázaly, že dynamin negativně reguluje polymeraci aktinu. Výsledek interakcí dynaminu a aktinu vytváří jakousi rovnováhu, která je nutná k zajištění úspěšné endocytózy (Liu et al., 2010).

V roce 2009 byl zveřejněn článek, který ukazuje nový pohled na CME a zapojení aktinu v savčím modelu. Autoři popisují dva typy odštěpení váčku. Prvním je klatrinová jamka, což je struktura poměrně malá, rychle se formující postupným hromaděním klatrinu, adaptorů a dalších regulačních proteinů, které umožňují deformovat membránu a bez komplikací vchlípit budoucí váček. Klatrinová jamka tedy nepotřebuje při odštěpení aktin. Druhou strukturou je klatrinový plak, který je mnohonásobně větší než klatrinová jamka, méně dynamický a jeho odštěpení nastává těsně pod plazmatickou membránou, a proto vyžaduje pro správnou funkci pomoc aktinu (Kirchhausen, 2009; Robertson et al., 2009b).

Současný výzkum se snaží odhalit zapojení dalších proteinů v savčím modelu. Známým savčím proteinem je Hip1R, který kromě své primární funkce ovlivňuje dynamiku aktinu při odštěpování. Byly vytvořeny modely, ve kterých dynamin, kortaktin a Hip1R spolupracují při odštěpení váčku. Komplex Hip1R a kortaktinu stabilizuje podobně jako čapkové proteiny vytvořená aktinová vlákna, což v důsledku pozitivně ovlivňuje roli Arp2/3 komplexu, zvýší se polymerace aktinových vláken, a tím se usnadní vchlípnutí budoucího váčku (Zhu et al., 2005). Teprve nedávno bylo odhaleno, že komplex Hip1R a kortaktinu je nezbytný pro formování a invaginaci klatrinových plaků. Primární funkcí Hip1R je propojovat aktin s plazmatickou membránou veziklu (Legendre-Guillemain et al., 2005; Wilbur et al., 2008).

Dynamiky odštěpení váčku se u savců účastní syndapiny. Tyto proteiny jsou zařazovány mezi dynamin vázající proteiny. Předpokládá se, že Syndapin I se současně váže

k dynaminu i WASP proteinu, který aktivuje Arp2/3 komplex. Dále syndapiny spolupracují s fosfatázami (synaptojaniny) a intersektinem. Intersektin pozitivně stimuluje skládání aktinových vláken (Kessels a Qualmann, 2004, 2006; McGavin et al., 2001).

V poslední době byl objeven další dynamin vázající protein SNX9 (sorting nexin 9), který je umístěn během třetí fáze CME na klatrinové jamky, kde vytváří interakce s plazmatickou membránou a ostatními proteiny. V *in vitro* případě stimuluje komplex WASP/Arp2/3, což má pozitivní vliv na polymeraci F-aktinu (Soulet et al., 2005).

Invaginační fáze savců se liší od kvasinek morfologickou strukturou budoucích váčků. U savců jsou budoucí váčky téměř celé pokryté klatrinem, jsou spojeny s membránou úzkými krčky a zřejmě aktin hraje v této fázi menší roli (Conibear, 2010).

Role aktinu v závěru třetí fáze je závislá na okolním prostředí a typu buňky. U savců i kvasinek je důležité správné odpláštění váčku, na kterém se podílí kinázy AAK / Ark1 a Prk1 / GAK pomocí fosforylace, Hsc70 a auxilin. U kvasinek na rozkladu vláken spolupracují proteiny koronin, kofilin (Sirotkin et al., 2010).

*S. cerevisiae* si vytvořila dva mechanismy, kterými uskutečňuje přemístění váčku do cílového kompartmentu. První způsob transportu probíhá pomocí tzv. „actin cables“. To jsou „dopravní pásy“ tvořené svazky aktinu, které slouží jako náhrada za nedostatek mikrotubulů v buňce (Huckaba et al., 2004). Druhou alternativou je neustálá nukleace a polymerace poměrně krátkých aktinových vláken tzv. „actin comet tails“. Není známo, jakým způsobem je pohyb váčku řízen (Goode et al., 2001). U savčích buněk jsou pozorovány tzv. „lateral movement“ pohyby váčku na krátkou vzdálenost, avšak transport váčku do cílového kompartmentu zajišťují mikrotubuly ve spolupráci s mikrotubulárními molekulárními motory (Taylor et al., 2011).

## 7 Shrnutí funkce aktinových vláken v průběhu CME

Jak je zřejmé z předcházející části, dynamika skládání a rozpadu aktinových vláken je pod přísnou kontrolou ABP.

Aktinová vlákna v endocytóze napomáhají (Merrifield, 2004):

- ❖ při odštěpování váčku
- ❖ generovat tlak na membráně
- ❖ vytvářet krátkodobý pohon pohybu nově zformovaných váčků mimo kortex buňky (např. při kaveolární internalizaci)

Využití aktinových vláken závisí na typu buňky a jejich bezprostředním okolí, u savčích buněk jsou aktinová vlákna v endocytóze často využívána ve specifických místech synapsí neuronů. Aktin hraje větší roli u takových membrán, které jsou rigidnější.

Obecně platí, že během tří fází endocytózy je organizace aktinu včetně dynamiky řízena specifickými interakcemi různých skupin proteinů. V první fázi endocytózy u kvasinek hraje aktin roli při stabilizaci místa, zatímco u savců nebývá zpravidla využit. Ve druhé fázi endocytózy je aktin využíván savčími i kvasinkovými buňkami při invaginaci. Využití aktinových vláken při odštěpení váčku je u kvasinek oproti savcům nezbytné. Aktinových struktur při váčkovém transportu více využívají kvasinky než savci, kteří také využívají mikrotubulární síť a dyneinů nebo kinezinů (Robertson et al., 2009b).

Kvasinky své váčky k endozómům transportují pomocí „actin cables“ nebo polymerací „comet tails“. Transport váčků ovlivňují signály GTPáz, jako je Rho a Rab (Lanzetti, 2007).

Kvasinka je důležitým modelem pro porozumění proteinového transportu u eukaryotických buněk, protože skvěle ovládá mechanismy tvorby váčku ze svých membrán. *S. cerevisiae* při procesu odštěpování váčku využívá spolupráci molekul, které charakterizují samostatné kategorie endocytózy - klatrin, dynamin, aktin.

Studium problematiky regulace aktinu u savčích buněk stále postrádá ustálené modely (Conibear, 2010).

## 8 Závěr

V této práci jsem se pokusila shrnout současné poznatky a diskutovat doposud popsané znalosti o aktinové polymeraci u savců a kvasinek, přestože některé informace v literatuře jsou protichůdné. Regulaci aktinu v endocytóze považuji za velice komplexní a složitý proces. Myslím, že komplexita interakcí v každé fázi endocytózy vysvětluje existenci velkého množství ještě nepotvrzených hypotéz. Je zřejmé, že vztah mezi procesy regulace aktinu a klatrinové endocytózy je vzájemný.

Při zpracovávání této problematiky jsem došla ke zjištění, že kvasinka je důležitým modelovým organismem a věnuje se jí drtivá většina experimentů, zatímco savčí buněčné linie zůstávají mírně stranou z důvodu složitosti systému a technické náročnosti.

Experimentální studie zahrnující tematiku regulace aktinu se často věnují nukleačním molekulám a NPF, protože iniciace nukleace aktinových vláken je klíčová pro celý proces regulace. K iniciaci aktinových vláken je zapotřebí činnosti specifických nukleačních proteinů. Iniciace umožní polymeraci, při které se uplatňují adaptorové proteiny plazmatické membrány budoucího váčku a stabilizátory aktinových vláken. Regulace aktinu je pod přísnou kontrolou regulačních proteinů. Správný průběh regulace aktinu během procesu CME musí být zakončen rozpadem vláken.

Proces regulace aktinu je popsán nedostatečně, vyskytuje se řada kontroverzí a některé mechanismy nejsou objasněny. To je případ polymerujících vláken aktinu při odštěpování váčku od membrány, vazby adaptorových proteinů vázajících se na aktin nebo konkrétních vazeb mezi proteiny. Čapkové proteiny u savčího modelu zatím nejsou prozkoumány vůbec.

Přestože je výzkum aktinového cytoskeletu velmi intenzivní, stále nemáme zcela jasnou představu o tom, proč savčí buněčné linie využívají aktinový cytoskelet v CME méně než *S. cerevisiae*.

Studium regulace aktinu v endocytóze přináší nové informace týkající se struktury jednotlivých regulačních proteinů a navíc může přispět k pochopení základních mechanismů signalizace, které jsou nepostradatelné pro velkou část buněčných procesů. Objasnění jedinečných rysů regulace aktinu u savců bude mít jistě zásadní význam pro porozumění základních principů výběru nákladu, membránové deformace a odštěpení váčku u všech organismů a typů buněk. Propojení aktinu s jeho molekulárními partnery a jeho správná regulace je dle mého názoru důležitým faktorem determinujícím endocytózu.

## 9 Seznam literatury

- Adams, A.E., a J.R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 98:934-945.
- Aghamohammadzadeh, S., a K.R. Ayscough. 2009. Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 11:1039-1042.
- Aguilar, R.C., H.A. Watson, a B. Wendland. 2003. The Yeast Epsin Ent1 Is Recruited to Membranes through Multiple Independent Interactions. *Journal of Biological Chemistry.* 278:10737 -10743.
- Allison, A.C. 1973. The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis. *Ciba Found. Symp.* 14:109-148.
- Amatruda, J.F., J.F. Cannon, K. Tatchell, C. Hug, a J.A. Cooper. 1990. Disruption of the actin cytoskeleton in yeast capping protein mutants. *Nature.* 344:352-354.
- Andrianantoandro, E., a T.D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 24:13-23.
- Ayscough, K.R., a D.G. Drubin. 1996. ACTIN: general principles from studies in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:129-160.
- Ayscough, K.R., J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews, a D.G. Drubin. 1997. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* 137:399-416.
- Bretscher, A. 1981. Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:6849-6853.
- Bruck, S., T.B. Huber, R.J. Ingham, K. Kim, H. Niederstrasser, P.M. Allen, T. Pawson, J.A. Cooper, a A.S. Shaw. 2006. Identification of a novel inhibitory actin-capping protein binding motif in CD2-associated protein. *J. Biol. Chem.* 281:19196-19203.
- Confalonieri, S., a P.P. Di Fiore. 2002. The Eps15 homology (EH) domain. *FEBS Lett.* 513:24-29.
- Conibear, E. 2010. Converging views of endocytosis in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology.* 22:513-518.
- Conner, S.D., a S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Costa, R., a K.R. Ayscough. 2005. Interactions between Sla1p, Lsb5p and Arf3p in yeast endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1273-1275.
- D'Agostino, J.L., a B.L. Goode. 2005. Dissection of Arp2/3 complex actin nucleation mechanism and distinct roles for its nucleation-promoting factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 171:35-47.

- Dikic, I. 2002. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett.* 529:110-115.
- Doherty, G.J., a H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78:857-902.
- Dominguez, R. 2009. Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44:351-366.
- Engqvist-Goldstein, A.E., M.M. Kessels, V.S. Chopra, M.R. Hayden, a D.G. Drubin. 1999. An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J. Cell Biol.* 147:1503-1518.
- Engqvist-Goldstein, A.E.Y., a D.G. Drubin. 2003. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:287-332.
- Evangelista, M., B.M. Klebl, A.H. Tong, B.A. Webb, T. Leeuw, E. Leberer, M. Whiteway, D.Y. Thomas, a C. Boone. 2000. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 148:353-362.
- Fazi, B., M.J.T.V. Cope, A. Douangamath, S. Ferracuti, K. Schirwitz, A. Zucconi, D.G. Drubin, M. Wilmanns, G. Cesareni, a L. Castagnoli. 2002. Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J. Biol. Chem.* 277:5290-5298.
- Firat-Karalar, E.N., a M.D. Welch. 2011. New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:4-13.
- Frieden, C., a D.W. Goddette. 1983. Polymerization of actin and actin-like systems: evaluation of the time course of polymerization in relation to the mechanism. *Biochemistry.* 22:5836-5843.
- Gagny, B., A. Wiederkehr, P. Dumoulin, B. Winsor, H. Riezman, a R. Hagenauer-Tsapis. 2000. A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J. Cell. Sci.* 113 ( Pt 18):3309-3319.
- Galletta, B.J., O.L. Mooren, a J.A. Cooper. 2010. Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:604-610.
- Gheorghe, D.M., S. Aghamohammadzadeh, I.I. Smaczynska-de Rooij, E.G. Allwood, S.J. Winder, a K.R. Ayscough. 2008. Interactions between the yeast SM22 homologue Scp1 and actin demonstrate the importance of actin bundling in endocytosis. *J. Biol. Chem.* 283:15037-15046.
- Goode, B.L., A.A. Rodal, G. Barnes, a D.G. Drubin. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J. Cell Biol.* 153:627-634.
- Gourlay, C.W., H. Dewar, D.T. Warren, R. Costa, N. Satish, a K.R. Ayscough. 2003. An interaction between Sla1p and Sla2p plays a role in regulating actin dynamics and endocytosis in budding yeast. *J. Cell. Sci.* 116:2551-2564.



- Huckaba, T.M., A.C. Gay, L.F. Pantalena, H.-C. Yang, a L.A. Pon. 2004. Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 167:519-530.
- Idrissi, F.-Z., H. Grötsch, I.M. Fernández-Golbano, C. Presciatto-Baschong, H. Riezman, a M.-I. Geli. 2008. Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 180:1219-1232.
- Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, a T. Takenawa. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*. 291:1047-1051.
- Jeng, R.L., a M.D. Welch. 2001. Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr. Biol.* 11:R691-694.
- Kaksonen, M., Y. Sun, a D.G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115:475-487.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, a D.G. Drubin. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*. 123:305-320.
- Kessels, M.M., a B. Qualmann. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 117:3077-3086.
- Kessels, M.M., a B. Qualmann. 2006. Syndapin oligomers interconnect the machineries for endocytic vesicle formation and actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 281:13285-13299.
- Kilmartin, J.V., a A.E. Adams. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* 98:922-933.
- Kim, K., B.J. Galletta, K.O. Schmidt, F.S. Chang, K.J. Blumer, a J.A. Cooper. 2006. Actin-based motility during endocytosis in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*. 17:1354-1363.
- Kim, K., A. Yamashita, M.A. Wear, Y. Maéda, a J.A. Cooper. 2004. Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J. Cell Biol.* 164:567-580.
- Kirchhausen, T. 2009. Imaging endocytic clathrin structures in living cells. *Trends Cell Biol.* 19:596-605.
- Kübler, E., a H. Riezman. 1993. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* 12:2855-2862.
- Kumari, S., S. Mg, a S. Mayor. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20:256-275.
- Lanzetti, L. 2007. Actin in membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:453-458.
- Le Clainche, C., D. Pantaloni, a M.-F. Carrier. 2003. ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:6337-6342.

- Legendre-Guillemain, V., M. Metzler, J.-F. Lemaire, J. Philie, L. Gan, M.R. Hayden, a P.S. McPherson. 2005. Huntingtin interacting protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *J. Biol. Chem.* 280:6101-6108.
- Legendre-Guillemain, V., S. Wasiak, N.K. Hussain, A. Angers, a P.S. McPherson. 2004. ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J. Cell. Sci.* 117:9-18.
- Lengsfeld, A.M., I. Löw, T. Wieland, P. Dancker, a W. Hasselbach. 1974. Interaction of phalloidin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:2803-2807.
- Liu, J., M. Kaksonen, D.G. Drubin, a G. Oster. 2006. Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:10277-10282.
- Liu, J., Y. Sun, D.G. Drubin, a G.F. Oster. 2009. The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol.* 7:e1000204.
- Liu, J., Y. Sun, G.F. Oster, a D.G. Drubin. 2010. Mechanochemical crosstalk during endocytic vesicle formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:36-43.
- Maciver, S.K., a P.J. Hussey. 2002. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 3:reviews3007.
- McGavin, M.K., K. Badour, L.A. Hardy, T.J. Kubiseski, J. Zhang, a K.A. Siminovitch. 2001. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J. Exp. Med.* 194:1777-1787.
- McPherson, P.S. 1999. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell. Signal.* 11:229-238.
- Merrifield, C.J. 2004. Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol.* 14:352-358.
- Merrifield, C.J., B. Qualmann, M.M. Kessels, a W. Almers. 2004. Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 83:13-18.
- Miki, H., S. Suetsugu, a T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* 17:6932-6941.
- Moseley, J.B., a B.L. Goode. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:605-645.
- Mulholland, J., D. Preuss, A. Moon, A. Wong, D. Drubin, a D. Botstein. 1994. Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 125:381-391.
- Newpher, T.M., R.P. Smith, V. Lemmon, a S.K. Lemmon. 2005. In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev. Cell.* 9:87-98.

- Okreglak, V., a D.G. Drubin. 2007. Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* 178:1251-1264.
- Pollard, T.D., a M.S. Mooseker. 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *The Journal of Cell Biology.* 88:654 -659.
- Pollard, T.D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 36:451-477.
- Qualmann, B., M.M. Kessels, a R.B. Kelly. 2000. Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J Cell Biol.* 150:111-116.
- Ramachandran, R. 2011. Vesicle scission: Dynamin. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 22:10-17.
- Ren, G., P. Vajjhala, J.S. Lee, B. Winsor, a A.L. Munn. 2006. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:37-120.
- Robertson, A.S., E.G. Allwood, A.P.C. Smith, F.C. Gardiner, R. Costa, S.J. Winder, a K.R. Ayscough. 2009a. The WASP homologue Las17 activates the novel actin-regulatory activity of Ysc84 to promote endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 20:1618-1628.
- Robertson, A.S., E. Smythe, a K.R. Ayscough. 2009b. Functions of actin in endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2049-2065.
- Robinson, R.C., K. Turbedsky, D.A. Kaiser, J.B. Marchand, H.N. Higgs, S. Choe, a T.D. Pollard. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 294:1679-1684.
- Rodal, A.A., A.L. Manning, B.L. Goode, a D.G. Drubin. 2003. Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins. *Curr. Biol.* 13:1000-1008.
- Roth, M.G. 2006. Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:63-68.
- Roth, T.F., a K.R. Porter. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti. L. *J. Cell Biol.* 20:313-332.
- Schafer, D.A., P.B. Jennings, a J.A. Cooper. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135:169-179.
- Sirotkin, V., J. Berro, K. Macmillan, L. Zhao, a T.D. Pollard. 2010. Quantitative Analysis of the Mechanism of Endocytic Actin Patch Assembly and Disassembly in Fission Yeast. *Mol Biol Cell.* 21:2894-2904.
- Slepnev, V.I., a P. De Camilli. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci.* 1:161-172.
- Smythe, E., a K.R. Ayscough. 2006. Actin regulation in endocytosis. *J. Cell. Sci.* 119:4589-4598.

- Soulet, F., D. Yarar, M. Leonard, a S.L. Schmid. 2005. SNX9 Regulates Dynamin Assembly and Is Required for Efficient Clathrin-mediated Endocytosis. *Mol Biol Cell*. 16:2058-2067.
- Stricker, J., T. Falzone, a M.L. Gardel. 2010. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech*. 43:9-14.
- Sun, Y., A.C. Martin, a D.G. Drubin. 2006. Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev. Cell*. 11:33-46.
- Taylor, M.J., D. Perrais, a C.J. Merrifield. 2011. A high precision survey of the molecular dynamics of Mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*. 9:e1000604.
- Thanabalu, T., R. Rajmohan, L. Meng, G. Ren, P.R. Vajjhala, a A.L. Munn. 2007. Verprolin function in endocytosis and actin organization. Roles of the Las17p (yeast WASP)-binding domain and a novel C-terminal actin-binding domain. *FEBS J*. 274:4103-4125.
- Vancompernelle, K., M. Goethals, C. Huet, D. Louvard, a J. Vandekerckhove. 1992. G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin beta 4. *EMBO J*. 11:4739-4746.
- Veltman, D.M., a R.H. Insall. 2010. WASP family proteins: their evolution and its physiological implications. *Mol. Biol. Cell*. 21:2880-2893.
- Warren, D.T., P.D. Andrews, C.W. Gourlay, a K.R. Ayscough. 2002. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J. Cell. Sci*. 115:1703-1715.
- Weihing, R.R. 1979. The cytoskeleton and plasma membrane. *Methods Achiev Exp Pathol*. 8:42-109.
- Wesp, A., L. Hicke, J. Palecek, R. Lombardi, T. Aust, A.L. Munn, a H. Riezman. 1997. End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 8:2291-2306.
- Wilbur, J.D., C.-Y. Chen, V. Manalo, P.K. Hwang, R.J. Fletterick, a F.M. Brodsky. 2008. Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J. Biol. Chem*. 283:32870-32879.
- Winder, S.J., a K.R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *J. Cell. Sci*. 118:651-654.
- Winder, S.J., T. Jess, a K.R. Ayscough. 2003. SCP1 encodes an actin-bundling protein in yeast. *Biochem. J*. 375:287-295.
- Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, a S.L. Schmid. 2005. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell*. 16:964-975.
- Yarmola, E.G., T. Somasundaram, T.A. Boring, I. Spector, a M.R. Bubb. 2000. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem*. 275:28120-28127.
- Zeng, G., X. Yu, a M. Cai. 2001. Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol. Biol. Cell*. 12:3759-3772.

Zheng, B., M. Han, M. Bernier, a J.-kun Wen. 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* 276:2669-2685.

Zhu, J., D. Yu, X.-C. Zeng, K. Zhou, a X. Zhan. 2007. Receptor-mediated endocytosis involves tyrosine phosphorylation of cortactin. *J. Biol. Chem.* 282:16086-16094.

Zhu, J., K. Zhou, J.-J. Hao, J. Liu, N. Smith, a X. Zhan. 2005. Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits. *J. Cell. Sci.* 118:807-817.

## 9.1 Elektronické zdroje

Cell Signaling Technology, Inc: Protein domains [online].  
Dostupné z <http://www.cellsignal.com/reference/domain/>

McMahonLab: Researching Endocytic mechanism[online].  
Dostupné z <http://www.endocytosis.org/>

Stanford Junion University: Saccharomyces Genom Database [online].  
Aktualizováno 25.2.2011. Dostupné z <http://yeastgenome.org/>

Uniprot Consorcium: Uniprot [online]. Aktualizováni 5.4.2011.  
Dostupné z <http://www.uniprot.org/>

## **10 Seznam příloh**

Příloha č. 1 – Skupiny regulačních proteinů dle funkce

Příloha č. 2 – Interakce proteinů zapojených v regulaci aktinu během CME

# Příloha č. 1

Tab. 1 – Skupiny regulačních proteinů dle funkce (Převzato z Smythe a Ayscough, 2006; Robertson et al., 2009b)

Homologní proteiny		Funkce	
Sacharomyces Cerevisiae	Savci		
regulátory Arp2/3, nukleace F-aktinu	Abp1	mAbp1	NPF, scaffold protein, ovlivňuje regulační kinázy Ark1 / AAK a Prk1 /GAK (Kaksonen et al. 2005)
	-	kortaktin	aktivuje Arp2/3 komplex (Merrifield, 2005)
	-	intersektin	se váže k WASP, nepřímo aktivuje polymeraci vláken (McGavin, 2001)
	Las17	WASP	aktivace Arp2/3 (Robertson et al., 2009; Galletta et al., 2008)
	Myo3, Myo5	myozin typu I	aktivuje Arp2/3, může zprostředkovat proces odštěpení (Evangelista et al., 2000; Sun et al., 2006)
	Pan1	Eps15	aktivuje Arp2/3, váže se k YAP180,Clc1, adaptorový protein, regulovaný Prk1 / GAK (Wendland a Emr, 1998)
regulace WASP	Bbc1	-	aktivátor Las17 (Sun et al. 2006)
	Crn	koronin	prokřivuje a svazuje vlákna aktinu, láká Arp2/3 k vláknům, omezuje nukleární aktivitu (Okreglak a Drubin, 2007)
	Sla1	CD2AP/CIN85	inhibuje Las17 / N-WASP, adaptorový protein, váže cargo proteiny (Costa et al. 2005; Costa a Ayscough 2005; Warren et al., 2002)
	Vrp1	WIP	regulace myozinu a Las17 / N-WASP (Ren et al., 2005; Rajmohan et al., 2009)
svazující a stabilizující proteiny	Cap1,Cap2	CapZ- $\alpha$ ,CapZ- $\beta$	stabilizují růst vláken (Amatruda et al., 1990)
	Sac6	fimbrin	svazuje a stabilizuje aktinová vlákna (Kübler a Riezman, 1993)
	Scp1	transgelin	svazuje a stabilizuje aktinová vlákna (Winder et al., 2003)
F-aktin depolymerující	Cof1	kofilin	narušuje F-aktin a vyvolává rozpad vláken, zabraňuje výměně ADP za ATP u monomerů (Okreglak & David G Drubin 2007)
léčení mezi váčkem F-aktinem	Sla2	HIP1R	propojuje aktin a plazmatickou membránu s PIP2, ovlivňuje skládání klatrinu, může svazkovat filamenta (Wilbur et al., 2008; Gourlay et al., 2003)
fosforylace aktinových struktur	Ark1, Prk1	AAK,GAK	Serin/treoninové kinázy, fosforylace proteinů, regulace rozpadu pláště (Smythe a Ayscough, 2003; Cope et al., 1999)
ostatní	Arp2/3 komplex	Arp2/3 komplex	nukleace a větvení aktinových vláken, aktivace NPFs (Goode, 2005; Dalhaimer a Pollard 2010; Galletta et al., 2008;)
	Act1/End7	aktin	tvoří cytoskeletální vlákna (Pollard a Weeds 1984; Zheng et al. 2009)
	Ent1,Ent2	epsin	váže klatrin,části plášťového komplexu (Wendland et al., 1999)
	Inp52	synaptojanin	reguluje množství PIP2 (Singer-Krüger et al., 1998)
	Rvs161,Rvs167	aphiphysin	účastní se odštěpení váčku (Lombardi a Riezman, 2001)
	YAP1801,YAP1802	AP180/CALM	skládá plášť klatrinu, váže klatrin a Pan1 / Eps15 (Wendland et al., 1999)

## Příloha č. 2

Tab. 1 – Interakce proteinů zapojených v regulaci aktinu během CME

Tato tabulka dokladuje obrovský počet interakcí, které celou regulaci ovlivňují, u Arp2/3 komplexu jsou uvedeny čísla jen pro Arp2 podjednotku (Převzato z <http://yeastgenome.org/>).

Protein	Interakce (fyzické a genetické) s proteiny	Počet interakcí
Abp1	Ark1, Prk1, Rvs167, synaptojanin, Myo5	124
Ark1	Abp1, Prk1, YAP1801, YAP1802, Vrp1	58
Arp2/3	Abp1, fornim, end3, Las17, Myo3, Myo5, Pan, Prk1, Rvs167, Rvs161, Sac6, Sla2, Vrp1	333
Cap1	Cof, Ede1, Cap2, Cdc42, formin, Bbc1, Arp1, Arc18, Vps27, Las17, Mss4	99
Cap2	Act, Bbc1, Cap1, Ede, Mss4, Myo2, Rvs161, Rvs167, Srv2, Cof1	97
Cof1	Act1, Aip1, Cap1, Cap2, Cml, Las17, Rvs161, Rs167, Sac3, Sac6, Sla1, Srv2	100
Myo3	Arc19, Arc40, Bck41, Myo5, Las17, Vrp1, Pan1, Bbc1, forminy, Bzz1, end3, Ysc84	106
Myo5	Act1, Myo3, Las17, Arc15, Arc40, Arc35, Arp2, Arp3, Bbc1, Bzz1, Pan1, Rvs167, Ysc84, Vrp1	199
Pan1	Act1, Ark1, Arc40, Arp2/3, end3, Ede1, Ent1, Myo5, Prk1, Sla1, Sla2	106
Prk	Arp2/3, end3, Ede1, Ent1, Glc7, Pan1, Sac6, Sac3, Sla1, Vrp1	159
Sac6	Abp1, Act1, Bbc1, Las17, Cap2, Cof1, Plk1, Prk1, Spc1, Sla2	126
Sla1	Abp1, Bbc1, forminy, klatrin, ede3, Ent1, Gcl7, Inp52, Las17, Myo5, Lsb3, Pan1, Rvs161, Vps1, Vrp1, Sla2	512
Sla2	Act1, Abp1, ede3, Ent1, Las17, Pan1, Lsb3, Sla1, Sla2, YAP1801, YAP1802, Ysc84, Prk1, Sac6	135
Las17	Abp1, Arc40, Arp2/3, Bcc1, Bzz1, Cap1, Cap2, klatrin, end3, Ent1, Las17, Lsb3, Lsb5, Lsb6, Myo3, Myo5, Mss4, Pan1, Prk1, Rvs161, Rvs167, She3, Sec16, Sac6, Scp1, Sla1, Sla2, Vps13, Vrp5, Vrp1, Ysc84	307
Vrp1	Act1, Arc40, Arc15, Arc35, Ark1, Arp2, Bbc1, forminy, Bzz1, Las17, Myo3, Myo5, Prk1, Rvs167, Sla1, Sla2	350